

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

S1 1 PN=JP 9224661

1/5/1
DIALOG(R)File 347:JAPIO
(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

05609861 **Image available**
GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND DNA CAPABLE OF CODING THE SAME

PUB. NO.: 09-224661 JP 9224661 A]
PUBLISHED: September 02, 1997 (19970902)
INVENTOR(s): HATAKEYAMA KAZUHISA
KUWABARA KOUICHIROU
KOBAYASHI MIKI
YUGAWA HIDEAKI
APPLICANT(s): MITSUBISHI CHEM CORP [000596] (A Japanese Company or
Corporation), JP (Japan)
APPL. NO.: 08-036345 [JP 9636345]
FILED: February 23, 1996 (19960223)
INTL CLASS: [6] C12N-009/04; C07H-021/04; C12N-015/09; C12N-001/20;
C12N-009/04; C12R-001/13; C12N-001/20; C12R-001/13
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1
(ORGANIC CHEMISTRY -- Organic Compounds)
JAPIO KEYWORD:R014 (MICROFILTERS)

ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To isolate the above enzyme, derived from a coryneform bacterium and capable of catalyzing a pentose phosphate cycle according to a gene recom bination technology.

SOLUTION: This glucose 6-phosphate dehydrogenase has an amino acid sequence represented by the formula. The enzyme is obtained by expressing a DNA (hereinafter referred to as a zwf gene), obtained from a chromosome of a coryneform bacterium, isolated and determined from a Brevibacterium flavum ML-233 (FERM BP-1497) strain and capable of coding the glucose 6-phosphate dehydrogenase in a coryneform bacterium. When the coryneform bacterium is transformed with the zwf gene, a bacterium capable of highly producing the glucose 6-phosphate dehydrogenase is obtained.

番号までの塩基配列で示されるものである。

【0011】本発明における *zwf* 遺伝子は、天然の細菌、例えば、コリネ型細菌の染色体DNAから分離されたもののみならず、本明細書記載の塩基配列を元に通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製システム1プラス (System-1 Plus) を用いて合成されたものであってもよい。また、前記の如くコリネ型細菌の染色体から取得される本発明のDNA断片は、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする機能を實質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていても、削除されていてもよく、新たに塩基が挿入されていてもよく、あるいは塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、さらにそれらの塩基配列にハイブリダイズする塩基配列であってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0012】

【実施例】以下、実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地〔組成：尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 20gを蒸留水に溶解して1リットルとする〕1リットル中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。

【0013】得られた菌体をリゾチームを10mg/mlの濃度で含有する溶液〔組成：10mM NaCl、20mM トリス緩衝液 (pH8.0)、1mM EDTA \cdot 2Na〕15mlに懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10 \sim 12℃で20分間、5,000 \times gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分中に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒で撚り取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得ら

れたDNAは、溶液〔組成：10mM トリス緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA \cdot 2Na〕5mlを加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0014】(B) *zwf* 遺伝子の部分断片の採取
エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) [J. Bacteriol., Vol. 173, p. 968 (1991)]、エルウィニア・クリサンセミ (*Erwinia chrysanthemi*) [Gene, Vol. 101, p. 51 (1991)]、および、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) [J. Biol. Chem., Vol. 266, p. 13028 (1991)]のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA遺伝子の塩基配列をもとに推定したアミノ酸配列の相同性部分の配列をもとに遺伝子クローニング用のPCRプライマーDNAを設計した。

【0015】ポリメラーゼ連鎖反応の一例を以下に示す。反応液は以下の組成である。濃度は最終濃度を表す。〔25ユニット/ml Taq DNAポリメラーゼ、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)、50mM KCl、1.5mM MgCl_2 、0.25mM dATP、0.25mM dCTP、0.25mM dGTP、0.25mM dTTP、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染色体DNA飽和水溶液、1 μM プライマー1：AT(ATC)GA(TC)CA(TC)TA(TC)(TC)TIGGIAA(AG)GA (配列番号1記載のアミノ酸配列174 \sim 181を元にして設計した配列：配列番号2)、1 μM プライマー2：GGIACICCI(TG)(GC)CCAIC (配列番号1記載のアミノ酸配列324 \sim 329を元にして設計した配列：配列番号3)、として100 μl の反応混合液を用いる。〕

ポリメラーゼ連鎖反応の反応条件は例えば、94℃で1分、55℃で2分、72℃で3分を1サイクルとする25サイクルである。そして上記反応で得られたDNAを精製した。

【0016】それぞれ最終濃度が、50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.9)、10mM MgCl_2 、20mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1unit/10 μl T4DNAリガーゼ、50ng/10 μl pGEM-Tベクター、10ng/10 μl PCR産物 となるように各成分を添加し、16℃で3時間反応させて、PCR産物DNAを結合させた。

【0017】ついで、常法 [J. Mol. Biol., 53, 159 (1970) 参照] に従って、得られた溶液を用いてエシエリヒア・コリJM109を形質転換した。得られた形質転換菌を選択培地〔組成：トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g、寒天 15g、アンピシリン 50mg、イソプロピオチオガラクトシド 0.238g、X-gal 0.2g、ジメチルホルムアミド2mlを蒸留水に溶解

して1リットルとする]に塗抹し、37℃で16時間培養した。

【0018】こうして得られたコロニーを青/白カラースクリーニングした。選択培地上に生育した菌株を、アンピシリンを最終濃度で50 μ g/ml含有するL培養液[トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5gを蒸留水に溶解して1リットルとする]に接種し、これを37℃で7時間培養した。培養液を4℃で10分間、8,000 \times gの遠心分離にかけて菌体を回収した。回収した菌体からアルカリ-SDS法[T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning, p. 90-91 (1982) 参照]によりプラスミドを抽出した。

【0019】次に、得られたプラスミドに挿入された染色体由来の約470bpのDNA断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法により決定した。具体的には、上記培養物より抽出したプラスミドDNAをパーキン・エルマー社製カタリスト800モレキュラー・バイオロジー・ラボステーション(CATALYST 800 Molecular Biology Labstation; Perkin-Elmer)を用いてプロトコルに従い反応させた後、パーキン・エルマー社製373A DNAシーケンサーによりプラスミドの挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

【0020】決定した塩基配列を翻訳して得られるタンパク質と、既知のエシエリヒア・コリのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとの相同性の比較により、それがプレビバクテリウム・フラバムMJ-233のzwf遺伝子の一部(配列表の配列番号1記載の塩基配列中1148番目から1614番目)であることが判明した。

【0021】(C) zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさ決定
染色体DNAを制限酵素BamHI、EcoRI、HindIII、SalIでそれぞれ分解した。これらをOncor社製Probe tech 2を用いてサザンハイブリダイゼーション用のナイロンメンブレンフィルターを作成した。

【0022】上記、PCRで得られたzwf遺伝子の部分断片を鋳型に、標識にはアマシャム社製[α -³²P] dCTP AA0005を用いて、宝酒造社製Random Primer DNA Labelling Kit Ver. 2の方法でプローブを標識した。フィルターを以下の組成の溶液[5 \times SSC溶液、5 \times デンハルト溶液、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)]で65℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った。なお20 \times SSC溶液

は、以下の組成[3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム]、100 \times デンハルト溶液は以下の組成[2% 牛血清アルブミン、2% ポリビニルピロリドン、2% フィコール]である。

【0023】上記で調製したプローブを加え、65℃で一晩、サザンハイブリダイゼーションを行った。フィルターを2 \times SSC、0.1% SDSで65℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを1 \times SSC、0.1% SDSで65℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製バイオイメーシングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0024】この結果、zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA制限酵素断片の大きさは、BamHI断片、EcoRI断片、HindIII断片、SalI断片が、それぞれ約2kb、3kb、8kb、10kbであった。

(D) zwf 遺伝子の部分断片を含む染色体DNA BamHI断片の単離
0.2% マルトース、10mM MgSO₄を添加したLB培養液に、エシエリヒア・コリP2329を接種し、37℃で培養した。そして遺伝子ライブラリー λ FIXIIファージ溶液400 μ lにP2329培養液を混合し、37℃で15分間培養した。次に4mlのストップアガー(50℃保温)を加え、スプレートに均一になるように撒いて、37℃で一晩培養した。

【0025】ニトロセルロースフィルターをスプレート上に空気が入らないように静かに置いて、予めフィルターに書いた目印の点をプレートに写した。フィルターを剥がし、吸着面を上にして、以下の混合溶液に浸した。濾紙上に置き、順次5分間処理した(溶液1:[0.5M NaOH、1.5M NaCl]、溶液2:[1M トリス-塩酸(pH7.5)、0.75M NaCl]、溶液3:2 \times SSC)。フィルターを乾燥させた後、80℃で30分間加熱してフィルターへDNAを固定化した。

【0026】フィルターを以下の混合溶液[5 \times SSPE、1 \times デンハルト溶液、50%ホルムアミド、0.1mg/ml SIGMA社製SALMON TESTES DNA For Hybridization (10mg/ml)]にて42℃、1時間プレハイブリダイゼーションを行った。20 \times SSPEの組成は、3.6M NaCl、0.2M NaH₂PO₄、0.02M EDTAである。上記(C)項で調製したプローブを加え、42℃で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。

【0027】フィルターを5 \times SSPE、1 \times デンハルト溶液、50%ホルムアミド溶液で42℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。次にフィルターを2 \times SSPE、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液で

42℃、15分間緩やかに振盪させながら洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。読みとりは、富士写真フィルム社製バイオイメージングアナライザーBAS-2000を用いた。

【0028】目的ブランクのソフトアガロースを砕いて、200 μ lのSM緩衝液に懸濁した。上記溶液10 μ lを、37℃で3～4時間培養したエシエリヒア・コリP2329株300 μ lと混合し、トップアガロースを加えて入プレートに撒いた。37℃で一晩培養し、ブランクを形成させた。この入プレートに4mlのSM緩衝液を加え、トップアガロースを掻き取って、4℃で1時間緩やかに振盪した。トップアガロースを混入させないように、上澄みを新しいチューブに移し、クロロホルムを数滴加えた。そして5,000rpmで5分間遠心し、上澄みを得た。さらにDNase及びRNase（最終濃度1 μ g/ml）を加え、37℃で15分間保温した。等量の20% ポリエチレングリコール（平均分子量6,000）-2M NaClを加え、氷上で1時間放置した後、4℃、10,000rpmで10分間遠心後、上澄みを完全に除去した。250 μ lのトリス-EDTA緩衝液を加えて懸濁し、5 μ lの10% ドデシル硫酸ナトリウムを加え、68℃で5分間加熱後、10 μ lの5M NaClを加え、等量のフェノール/クロロホルムを加え、よく懸濁した。12,000rpmで10分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。イソプロパノール沈殿後、70% エタノール洗浄・乾燥させ、50 μ lのトリス塩酸緩衝液に懸濁した。

【0029】以上の操作で得られたFIXII DNAをBamHIで切断した。切断物をアガロース電気泳動して、zwf遺伝子の一部を含む染色体DNAのBamHI断片を分離・精製した。このBamHI断片約2kbをpUC118でサブクローニングした。サブクローニングしたBamHI断片約2kbを含むpUC118をBamHIで切断し、BamHI断片を回収した。

【0030】(E) zwf遺伝子上流の塩基配列決定 (D)項で得られた大きさ約2kbのDNA断片溶液を制限酵素Sau3A1を用いて37℃で処理してDNA断片を部分分解した。また、クローニングベクターpUC118を制限酵素BamHIで切断した。得られたベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを混合し、この混合液にそれぞれ最終濃度が50mM トリス緩衝液 (pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、および1unit 10 μ l T4DNAリガーゼとなるように各成分を添加し、ベクターDNA断片と部分分解DNA断片とを結合させた。

【0031】上記と同様に大きさ約2kbのDNA断片溶液を制限酵素TaqIと反応させて部分分解DNA断片を調製した。クローニングベクターpUC118を制限酵素AccIで切断した後、これを上記と同様にして

部分分解DNAと結合させた。得られたプラスミド混液を用い、常法によりエシエリヒア・コリJM109株を形質転換し、前記の選択培地に塗抹した。

【0032】上記選択培地に生育した菌株を常法に従い液体培養し、得られた培養物よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを用いて、ベクターpUC118に挿入された部分分解DNA断片の塩基配列を決定した。そして、これらの個々の配列の連結は、パーキン・エルマー社製のシーケンズ解析ソフト オートアッセンブラー (Autoassembler) を用いて行った。

【0033】この結果、配列表1記載の塩基配列中の1番目から1965番目の塩基配列が判明した。それを翻訳したタンパク質のアミノ酸一次構造と既知のエシエリヒア・コリのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸一次構造との相同性の比較により、配列表1記載の塩基配列中の629番目から1965番目がプレビバクテリウム・フラバムMJ-233のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームの上流であることが判明した。

【0034】(F) zwf遺伝子の全塩基配列決定 オープンリーディングフレームの下流部分をクローニングするために、インバースポリメラーゼ連鎖反応 [例えば、結城博、実験医学、Vol. 8, No. 9 (増刊)、p. 49 (1990) 参照] を行った。まず染色体DNAをEcoRIで分解した。このDNA分解物をアガロースゲル電気泳動した後、(C)で得られた結果を参考にして3kb前後のDNA分解物を含むアガロースゲルを切り出した。

【0035】このアガロースゲル中から、BIO101社製GENECLEAN IIを用いてDNA分解物を抽出した。そして以下の組成 [50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.9)、10mM MgCl₂、20mM ジチオスレイトール、1mM ATP、1unit/10 μ l T4DNAリガーゼ、10 μ g/ml 染色体DNAのEcoRI分解物] となるように各成分を添加し、16℃で一晩反応させて、DNA分解物を自己結合させた。

【0036】続いて、プライマー対 [CTGAGCTGGAAGATTC TGG (配列番号1記載の塩基配列の1943番目から1959番目: 配列番号4)、CGAAGCTGCATCATCATC (配列番号1記載の塩基配列の875番目から893番目の相補鎖: 配列番号5)] を用いて、上記の自己結合染色体DNA EcoRI分解物を鋳型に、常法でポリメラーゼ連鎖反応をした。

【0037】得られたDNAを前記の方法でpGEM-Tベクターに結合し、エシエリヒア・コリJM109でサブクローニングし、アルカリ-SDS法で抽出した。そして挿入断片の塩基配列をジデオキシヌクレオチド酵素法で決定した結果、配列表1記載の塩基配列中196

6番目から2260番目の塩基配列であることが明らかになった。

【0038】以上の結果、配列表1に示す大きさ約2,260bpのDNA塩基配列を決定した。決定した塩基配列中にはオープンリーディングフレームの存在が認められた。それを翻訳したタンパク質のアミノ酸一次構造と既知のエシエリヒア・コリのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸一次構造との相同性の比較により、配列表の配列番号1記載の塩基配列中629番目から2083番目ががブレヴィバクテリウム・フラバム MJ-233のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子であり、該酵素のアミノ酸配列は、配列番号1記載のアミノ酸配列であることが判明した。

【0039】

【発明の効果】本発明により提供されるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を用いてコリネ型細菌を育種改良することにより、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ高産生能を有するコリネ型細菌の取得が可能となる。

【0040】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2260

鎖の数：二本鎖

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

GATCCGATGA GGCTTTGGCT CTGCGTGGCA AGGCAGGCGT TGCCAACGCT CAGCGCGCTT	60
ACGCTGTGTA CAAGGAGCTT TTCGACGCCG CCGAGCTGCC TGTAAGGCGC CAACACTCAG	120
CGCCCACTGT GGGCATCCAC CGGCGTGAAG AACCTGCGT ACGCTGCAAC TCTTTACGTT	180
TCCGAGCTGG CTGGTCCAAA CACCGTCAAC ACCATGCCAG AAGGCACCAT CGACGCTGTT	240
CTGGAAGTGG GCAACCTGCA CGGTGACAAC CTGTCCAAC CCGCGGCAGA AGCTGACGCT	300
GTGTTCTCCC AGCTTGAGGC TCTGGGCGTT GACTTGGCAG ATGTCTTCCA GGTCTGGAG	360
ACCGAGGCCG TGGACAAGTT CGTTGCTTCT TGGAGCGAAC TGCTTGAGTC CATGGAAGCT	420
CGCCTGAAGT AGAATCAGCA CGCTGCATCA GTAACGGCGA CATGAAATCG AATTAGTTCG	480
ATCTTATGTG GCCGTTACAC ATCTTTCATT AAAGAAAGGA TCGTGACGCT TACCATCGTG	540
AGCACAAAAC ACGACCCCTT CCAGCTGGAC AAACCCACTG CGCGACCGCG AGGATAAAGC	600
ACTCCCCCGC ATCGCTGGCC CTTCGGGC	628
ATG GTG ATC TTC GGT GTC ACT GGC GAC TTG GCT CGA AAG AAG CTG CTC	676
Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu	
1 5 10 15	
CCC GCC ATT TAT GAT CTA GCA AAC CGC GGA TTG CTG CCC CCA GGA TTC	724
Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe	
20 25 30	
TGG TTG GTA GGT TAC GGC CGC CGC GAA TGG TCC AAA GAA GAC TTT GAA	772
Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu	
35 40 45	
AAA TAC GTA CGC GAT GCC GCA AGT GCT GGT GCT CGT ACG GAA TTC CGT	820
Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg	
50 55 60	
GAA AAT GTT TGG GAG CGC CTC GCC GAG GGT ATG GAA TTT GTT CGC GGC	868
Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly	
65 70 75 80	
AAC TTT GAT GAT GAT GCA GCT TTC GAC AAC CTC GCT GCA ACA CTC AAG	916
Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
85 90 95	
CGC ATC GAC AAA ACC CGC GGC ACC GGC AAC TGG GCT TAC TAC CTG	964
Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
100 105 110	
TCC ATT CCA CCA GAT TCC TTC GCA GCG GTC TGC CAC CAG CTG GAG CGT	1012
Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Ala Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
115 120 125	

TCC GGC ATG GCT GAA TCC ACC GAA GAA GCA TGG CGC CGC GTG ATC ATC	1060
Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
130 135 140	
GAG AAG CCT TTC GGC CAC AAC CTC GAA TCC GCA CAC GAG CTC AAC CAG	1108
Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln	
145 150 155 160	
CTG GTC AAC GCA GTC TTC CCA GAA TCT TCT GTG TTC CGC ATC GAC CAC	1156
Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His	
165 170 175	
TAT TTG GGC AAG GAA ACA GTT CAA AAC ATC CTG GCT CTG CGT TTT GCT	1204
Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala	
180 185 190	
AAC CAG CTG TTT GAG CCA CTG TGG AAC TCC AAC TAC GTT GAC CAC GTC	1252
Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val	
195 200 205	
CAG ATC ACC ATG GCT GAA GAT ATT GGC TTG GGT GGA CGT GCT GGT TAC	1300
Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr	
210 215 220	
TAC GAC GGC ATC GGC GCA GGC CGC GAC GTC ATC CAG AAC CAC CTG ATC	1348
Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile	
225 230 235 240	
CAG CTC TTG GCT CTG GTT GCC ATG GAA GAA CCA ATT TCT TTC GTG CCA	1396
Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro	
245 250 255	
GCG CAG CTG CAG GCA GAA AAG ATC AAG GTG CTC TCT GCG ACA AAG CCG	1444
Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro	
260 265 270	
TGC TAC CCA TTG GAT AAA ACC TCC GCT CGT GGT CAG TAC GCT GCC GGT	1492
Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly	
275 280 285	
TGG CAG GGC TCT GAG TTA GTC AAG GGA CTT CGC GAA GAA GAT GGC TTC	1540
Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe	
290 295 300	
AAC CCT GAG TCC ACC ACT GAG ACT TTT GCG GCT TGT ACC TTA GAG ATC	1588
Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile	
305 310 315 320	
ACG TCT CGT CGC TGG GCT GGT GTG CCG TTC TAC CTG CGC ACC GGT AAG	1636
Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys	
325 330 335	
CGT CTT GGT CGC CGT GTT ACT GAG ATT GCC GTG GTG TTT AAA GAC GCA	1684
Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala	
340 345 350	
CCA CAC CAG CCT TTC GAC GGC GAC ATG ACT GTA TCC CTT GGC CAA AAC	1732
Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn	
355 360 365	
GCC ATC GTG ATT CGC GTG CAG CCT GAT GAA GGT GTG CTC ATC CGC TTC	1780
Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe	
370 375 380	
GGT TCC AAG GTT CCA GGT TCT GCC ATG GAA GTC CGT GAC GTC AAC ATG	1828
Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met	

385	390	395	400	
GAC TTC TCC TAC TCA GAA TCC TTC ACT GAA GAA TCA CCT GAA GCA TAC	1876			
Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr				
405	410	415		
GAG CGC CTT ATC TTG GAT GCG CTG TTG GAT GAA TCC AGC CTT TTC CCT	1924			
Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro				
420	425	430		
ACC AAC GAG GAA GTG GAA CTG AGC TGG AAG ATT CTG GAT CCA ATT CTT	1972			
Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu				
435	440	445		
GAA GCA TGG GAT GCC GAT GGA GAA CCA GAG GAT TAC CCA GCA GGT ACG	2020			
Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr				
450	455	460		
TGG GGT CCA AAG AGC GCT GAT GAA ATG CTT TCC CGC AAC GGT CAC ACC	2068			
Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr				
465	470	475	480	
TGG CGC AGG CCA TAATTTAGGG GCAAAAAATG ATCTTTGAAC TTCCGGATAC	2120			
Trp Arg Arg Pro				
484				
CACCACCCAG CAAATTTCCA AGACCCTAAC TCGACTGCGT GAATCGGGCA CCCAGGTCAC	2180			
CACCGGCCGA GTGCTCACCC TCATCGTGGT CACTGACTCC GAAAGCGATG TCGCTGCAGT	2240			
TACCGAGTCC ACCAATGAAG	2260			
配列番号: 2				
配列の長さ:				
鎖の数: 1本鎖				
配列の型: 核酸				
トポロジー: 直鎖状				
配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)				
配列				
ATHGAYCAIT AYYTNGGNAA RGA	23			
Nはイノシンを表す。				
配列番号: 3				
配列の長さ:				
鎖の数: 1本鎖				
配列の型: 核酸				
トポロジー: 直鎖状				
配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)				
配列				
GGNACCCNK SCCANC	16			
Nはイノシンを表す。				
配列番号: 4				
配列の長さ:				
鎖の数: 1本鎖				
配列の型: 核酸				
トポロジー: 直鎖状				
配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)				
配列				
CTGAGCTGGA AGATTCTGG	19			
配列番号: 5				
配列の長さ:				
鎖の数: 1本鎖				
配列の型: 核酸				
トポロジー: 直鎖状				
配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)				
配列				
CGAAAGCTGC ATCATCATC	19			

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:13)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号
三菱化学株式会社筑波研究所内